DOI: 10.4274/mjima.galenos.2019.2019.18

Mediterr J Infect Microb Antimicrob 2019;8:18

Erişim: <http://dx.doi.org/10.4274/mjima.galenos.2019.2019.18>

Mediterr J Infect Microb Antimicrob 2019 8 :18'de Yayınlanmış Olan İngilizce Yazının Birebir Türkçe Versiyonudur.

Biyofilm İlişkili Enfeksiyonlar: Tanı, Tedavi ve Korunma

Biofilm-Related Infection: Diagnosis, Treatment, and Prevention

Ayşe KALKANCI¹, Özlem GÜZEL TUNÇCAN²¹Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye²Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Öz

Biyofilmler ortopedik protez implantları, endotrakeal tüpler, vasküler kateterler, üriner kateterler, doku dolgu implantları gibi araç ilişkili enfeksiyonlara, kronik yara enfeksiyonlarına ve kistik fibrozisli hastalarda kronik akciğer enfeksiyonları gibi enfeksiyonlara neden olabilirler. Biyofilm enfeksiyonlarının tanı ve tedavisi genellikle güçtür. Tanıda biyofilmin yerinde tanımlanmasına yönelik görüntüleme yöntemleri ve biyofilmi oluşturan mikroorganizmanın tanımlanmasına yönelik mikrobiyolojik yöntemler bulunmaktadır. Günümüzde tanı ve tedavisinde yaşanan güçlükler ve özellikle antibiyotik direnç sorunları gibi problemlere yönelik farklı tedavi yaklaşımları araştırılmaktadır. Çeşitli antibiyotiklerle birlikte fotodinamik tedavi, antibiyotik kilit tedavisi ve çeşitli biyofilm etkili biyoaktif molekül/enzim tedavilerin yakın gelecekte daha yaygın kullanılacağı öngörülmektedir. Bu derlemenin amacı biyofilm ilişkili enfeksiyonların tanı, tedavi ve korunma yöntemlerinin gözden geçirilmesidir.

Anahtar Kelimeler: Ekinokandinler, kronik yara, protez eklem enfeksiyonları, "Quorum sensing" inhibitörleri, antibiyotik kaplı implantlar

Abstract

Biofilms can cause infections associated with orthopedic devices, endotracheal tubes, intravenous catheters, urinary catheters, and tissue fillers as well as chronic wound infections, and chronic lung infections in cystic fibrosis patients. The diagnosis and treatment of biofilm-related infections are difficult. For diagnosis, there are methods for imaging the biofilm at the site of infection, as well as microbiological methods for identifying the microorganism causing the biofilm infection. In recent years, different therapeutic approaches have been investigated to address difficulties in the diagnosis and treatment of biofilm-related infections, particularly problems such as antibiotic resistance. Together with various antibiotics, it is predicted that antimicrobial photodynamic therapy, antimicrobial lock therapy, and various bioactive molecules/enzymes with antibiofilm activity will become more widely used as therapeutic models in the future. The aim of this paper was to review methods of diagnosis, treatment, and prevention of biofilm-related infections.

Keywords: Echinocandins, chronic wound, prosthetic joint infections, "Quorum-sensing" inhibitors, antibiotic-coated implants

Giriş

Biyofilm enfeksiyonları tekrarlayan, kronikleşen veya uzun süreli antibiyotik kullanımı gereksiniminden doğabilecek direnç gelişme riskinden dolayı klinikte önemli bir yer tutmaktadır. Bu hasta grubunda tedavi yönetimi gerçekten zor olabilmektedir. Biyofilm enfeksiyonları, klinik pratikte araç (alet) ilişkili enfeksiyonlar veya doku enfeksiyonları olarak görülebilmektedir.

Biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlar açısından önemli tıbbi araçlar; vasküler santral/periferik kateterler, periton diyaliz kateterleri, ventriküler araçlar, kontak lens, protez kardiyak kapaklar, kalp pilleri, vasküler greftler, meme implantları, doku dolgu implantları, protez eklem gibi ortopedik protez implantları, ses protezleri ve rahim içi araçlar olarak sayılabilmektedir. Doku enfeksiyonları olarak; kistik fibrozisli hastalarda görülen tekrarlayan akciğer enfeksiyonları, üriner sistem enfeksiyonları,

Atıf: Kalkancı A, Güzel Tunçcan Ö. Biofilm-Related Infection: Diagnosis, Treatment, and Prevention. Mediterr J Infect Microb Antimicrob. 2019;8:18.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Özlem Güzel Tunçcan,
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye
Tel.: +90 312 202 54 33 E-posta: oguzel@gazi.edu.tr ORCID ID: orcid.org/0000-0003-1611-0725
Geliş Tarihi/Received: 05.01.2019 Kabul Tarihi/Accepted: 22.05.2019
©Telif Hakkı 2019 Türkiye Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği
Mediterranean Journal of Infection Microbes and Antimicrobials, Galenos Yayinevi tarafından yayınlanmıştır.

Yayınlanma tarihi: 17 Haziran 2019

safra kesesi enfeksiyonları, kronik sinüzit, otitis media, diş plakları, periyodontit, böbrek taşları, osteomyelit, vajen enfeksiyonları ve kronik yara enfeksiyonları ile sıklıkla karşılaşılabilir^[1,2].

Biyofilm oluşturma eğilimi yüksek olan Gram-olumlu patojenler; *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* spp., *Enterococcus faecium*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus pyogenes*, *Actinomyces viscosus*, Gram-olumsuz patojenler; *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Serratia marcescens*, *Aeromonas hydrophila*, *Brucella melitensis*, *Burkholderia cepacia*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* ve *Yersinia pestis*'dir. Mantarlardan, *Candida* türlerinden; *C. albicans*, *C. parapsilosis*'in, *Aspergillus* ve *Fusarium* türlerinin biyofilm oluşturma potansiyeli daha yüksektir^[1-4].

Bu derlemenin amacı biyofilm ilişkili enfeksiyonların tanı, tedavi ve korunma yöntemlerinin gözden geçirilmesidir.

Biyofilm Nedir?

Mikroorganizmaların tutundukları yüzeyde bir topluluk oluşturmaları ve hücre dışı polimerler tarafından kaplanan bir kütle haline gelmelerine biyofilm veya slime tabaka denir. Tutundukları yüzey canlı bir doku olabileceği gibi, kateterler gibi sentetik bir yüzey de olabilir. Biyofilmin temel özelliği mikroorganizma kolonisinin dışında, koloniyi bir kabuk gibi saran ve dış etkilere koruyan bir polimer tabakanın bulunmasıdır. Biyofilm tabaka sayesinde mikroorganizma topluluğu, yüzeyde koloni oluşturur, enfeksiyon gelişimi hızlanır, bağışıklık sisteminden kaçır ve antimikrobiyal dirençli hale gelir. Biyofilmin oluşum basamakları; 1. Mikroorganizmaların yüzeye tutunması, 2. Mikrokoloni oluşumu, 3. Olgun biyofilm oluşması ve 4. Biyofilmden dağılma ile yeniden tutunma basamağından döngünün tekrar başlamasıdır. Biyofilmin içeriğinde %95-97 su bulunmaktadır. Mikroorganizmalar %2-5, DNA-RNA %1-2, polisakkaritler %1-2, proteinler %1-2 oranında biyofilmin içeriğine katılır. Biyofilm içeriği ayrıntılı olarak incelendiğinde polisakkaritler, alginat, pel, psl gibi ekzopolisakkaritler, poli-gama glutamat, tip 4 pili, CupA fimbria, lektin bağlayan proteinler gibi yüzey proteinleri, hücre dışı DNA, N-asetil glukozamin polimerleri ve Baps (biyofilm ile ilişkili proteinler) bulunduğu görülmüştür. Biyofilmi oluşturan mikroorganizmalara bağlı olmak üzere biyofilm içeriği değişkenlik gösterebilmektedir^[5].

Sağlık personeline biyofilmin ne olduğu ve önemi ile ilgili bir anket yapılmış ve 1.223 kişiden alınan cevaplar düzenlendiğinde, çoğunun biyofilm tanımını bildiği, ancak en bilinmeyen konuların kronik yaralardan biyofilmin sorumlu olduğu, yara debridmanı ve yara örtülerinin biyofilm ile mücadeledeki etkisi, biyofilm tanısı ve biyofilm tedavisinde antimikrobiyal gibi başlıklar olduğu görülmüştür^[6].

Biyofilmi Oluşturan Mikroorganizmanın Tanısı

Biyofilm tanısı mikroorganizmanın gösterilmesi ve tanımlanması açısından mikrobiyolojinin konusu olabileceği gibi, yüzeyi kaplayan kitlenin izlenmesi, ölçülmesi gibi konuları içermesi açısından da malzeme bilimi ve mühendislik alanlarını ilgilendirmektedir. Tıpta kullanılmayan bazı görüntüleme ve ölçüm sistemleri biyofilm tanısında kullanılmaktadır. Biyofilmin klasik tanısı mikrobiyolojik olarak kültür temelli yöntemlerdir. Kültürde üreyen mikroorganizmanın tanımlanması için klasik yöntemler ve MALDI-TOF gibi protein temelli yeni tanımlama yöntemleri kullanılabilir. Biyofilmin görüntülenmesine dayalı mikrobiyolojik yöntemler de bulunmaktadır. Ayrıca moleküler yöntemler ile biyofilm oluşumundan sorumlu genler gösterilebilir. Araç ilişkili enfeksiyonlarda ve tekrarlayan kronik doku enfeksiyonlarında biyofilmin tanımlanması gereklidir. Hastaya ve hastanın enfeksiyon bölgesine göre alınacak örnekler uygun bir tanımlama yöntemi seçilmelidir^[6-8].

1. Klasik Yöntemler

Christensen ve ark.'nın^[9,10] 1982 yılında *Staphylococcus epidermidis* için tanımladığı "tüp adezyon yöntemi" biyofilmin temeli olan slime faktörün gösterilmesinde kullanılan en klasik yöntemdir. Bu yöntemde sentetik yüzeyde oluşan biyofilm tabaka kristal viyole ve safranin gibi boyalar kullanılarak görsel olarak değerlendirilmektedir. Deney tüpleri yerine, mikropakta oluşturulan biyofilmin spektrofotometrik olarak ölçülmesi, Christensen ve ark.'nın^[9,10] yönteminin dönüştürülmesi ve geliştirilmesi ile ortaya çıkan yeni yöntemlerdir. Slime faktör üreten kökenler bu yöntem ile ayrılmaktadır. Adezyon görsel olarak değerlendirildiğinde, bir pozitiften dört pozitif kadar skorlama yapılabilmektedir. Tam bir sayısal ölçüm olmamakla birlikte, oluşan slime tabakanın görsel olarak derecelendirilmesi, literatürde kabul görmüş bir yöntemdir. Oluşan biyofilm ölçüldüğünde tam bir sayısal karşılaştırma yapmak mümkündür. Spektrofotometrik değerlendirme özellikle anti-biyofilm yaklaşımların etkinliğinin değerlendirildiği çalışmalarda zorunludur. Bir ölçüm değeri verilmesi gerektiği koşullarda, spektrofotometrik karşılaştırma önerilmektedir. Alamar mavisi olarak da bilinen resazurin (7-hidroxy-3H-phenoxazin-3-one-10-oxide) canlı hücreye hasar vermeyen biyolojik bir boyadır. Hücrelerin metabolik aktivitesi sonrasında pembe renkli resorufine dönüşmektedir. Resorufin spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Benzer şekilde, mikroorganizmaların metabolizması sonucu ortamdaki 2,3-bis (2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[[fenilamino] karbonil] - 2H-tetrazolyum hidrosit tuzu (XTT) suda çözünen formazan haline çevrilir^[7].

Bir mikroorganizmanın biyofilm üretip üretmediği test edileceği zaman ise, sadece "var-yok" şeklinde sonuç veren yöntemler tercih edilebilir. Freeman ve ark.^[11], 1989 yılında agar temelli bir

yöntem tanımlamıştır^[11]. Bu yöntemde kongo kırmızısı içeren agar plaklarında slime faktör pozitif kolonilerin koyu, negatif kolonilerin ise renksiz koloniler oluşturmalarına göre ayırım yapılmaktadır. Sayısal bir değer verilmesi mümkün değildir.

"Calgary aracı" 1990'lı yıllarda antibiyotiklerin biyofilm üzerine etkinliğinin gösterilmesi amacıyla geliştirilmiştir. "Calgary aracı" iki parçadan oluşan bir mikroplağın kullanıldığı bir model yöntemidir. Şekil 1'de yöntemin basamakları gösterilmektedir. Kapak benzeri, üstteki parçada 96 adet uç bulunmaktadır. Bu uçlar alttaki parçayı oluşturan, standart 96 kuyucuklu mikropaklar içine tam olarak giren, kuyucuk içinde oluşan biyofilmi bozmadan bir başka sıvı veya katı ortama aktarabilen bir yüzey görevi görmektedir. "Calgary aracı" sayesinde herhangi bir antimikrobiyal maddenin biyofilm üzerindeki inhibitör etkisi koloni sayımı üzerinden değerlendirilebilmektedir. "Calgary aracı" vazgeçilmez bir klasik yöntemdir. Günümüzde çeşitli dönüşümler ile kullanılmaya devam etmektedir^[12-14].

Biyofilm hareketsiz değildir. Vücut sıvılarının ve mikroorganizma kolonisinin sürekli akış oluşturduğu bir ortamda oluşmaktadır. Dinamik bir yapısı olduğu için, biyofilm modellerinin de durağan modeller yerine, hareketli perfüzyon modelleri ile geliştirildiği görülmüştür. Biyofilm perfüzyon modeli ile gerçeğe yakın bir canlandırma yapılması mümkün olmuştur^[15]. Kateteri temsil eden bir tüp içinden akan mikroorganizma içeren sıvı zamanla kateter yüzeyine tutunmaya başlar. İki adet pompanın yer aldığı perfüzyon modelinde birinci pompa ile akış hızının düzenlenmesi mümkündür. İkinci pompa ile antimikrobiyal maddenin ortama verilmesi kontrol edilmektedir. Kateteri temsil eden tüp içinden ayrılan hücrelerde her türlü sayım yapılabilmektedir. Katatere

kilit uygulaması gibi anti-biyofilm yaklaşımların kantitatif olarak değerlendirilebilmesi bu modelde mümkündür^[15].

2. Biyofilm Tanısında Kullanılan Görüntüleme Yöntemleri

Hücreye tutunan mikroorganizmanın sayılarak değerlendirilmesi kullanılagelen bir yöntemdir. Işık mikroskobu iki boyutlu görüntü sunduğu için tam olarak biyofilmin ölçümüne olanak sağlayamaz. Biyofilmin görüntülenmesi için klasik olarak kullandığımız görüntüleme sistemleri yanında, güncel olarak geliştirilmiş yeni sistemler de kullanılabilmektedir^[16]. Üç boyutlu ölçülebilir görüntü sunan, elektron mikroskobisi, biyofilm kütlesinin gösterilmesinde uzun zamandır kullanılmaktadır. Taramalı elektron mikroskobisi 'scanning electron microscopy' (SEM) ile mikrokoloninin yüzeyinin, geçirimli elektron mikroskobu 'transmission electron microscopy' ile biyofilm kütlesinin iç yapısının görüntülenmesi mümkün olmaktadır. Atomik güç mikroskobu (AFM) gelişmiş bir elektron mikroskobu olarak kabul edilebilir. Çok büyütmede özellikle yüzeylerin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Tıpta kullanımı çok yaygın olmayan AFM ile mühendislik bilimlerinde yüzeylerin gösterilmesi ve ölçümü yapılabilmektedir. Yüzey pürüzlülüğü gibi bir ölçüm değeri içerdiği için biyofilm çalışmalarında da kullanılabileceği bildirilmektedir^[17].

Lazer taramalı mikroskopi, manyetik rezonans görüntüleme ve tarayıcı geçirmeli X-ray mikroskobisi yeni geliştirilmiş görüntüleme yöntemleridir. Bu yeni yöntemlerin üstünlüğü biyofilmin sadece kalınlığının değil, iç yapısının da ayrıntılı olarak gösterilmesidir. Hibridizasyon ve floresans tekniklerin eklenmesi ile biyokütlenin içinde yer alan bütün yapılar tanımlanabilmektedir^[18].

"Calgary aracı" ile biyofilmin gösterilmesi ve sayımı

Şekil 1. "Calgary" biyofilm aracı

Tablo 1. Biyofilm tanı yöntemleri

Yöntemler		Avantajları	Dezavantajları	ESCMID rehberi
Klasik yöntemler	Tüp adezyon yöntemi-görsel değerlendirme	Kolay	Subjektif değerlendirme	Yok
	Mikroplak adezyon yöntemi-spektrofotometrik değerlendirme	Sayısal değer verir Karşılaştırma yapılabilir Anti-biyofilm etki ölçülebilir	Spektrofotometre gerektirir	Yok
	Kongo kırmızılı agar yöntemi	Kolay Var-yok sonuç	Sayısal değer vermez	Yok
	Calgary aracı	Sayısal değer verir Karşılaştırma yapılabilir Anti-biyofilm etki ölçülebilir	Özel mikroplak gerektirir	Yok
	Hareketli perfüzyon modelleri	Kilit tedavilerini değerlendirir Anti-biyofilm ilaçları değerlendirir	Pahalı cihaz gerektirir	Yok
Görüntüleme yöntemleri	Işık mikroskobu	-	İki boyutlu Değerlendiremez	Var
	SEM	Üç boyutlu yüzey analizi	İç kütle görülemez Cihaz ve deneyimli merkez gerektirir	Var
	TEM	Üç boyutlu ve iç kütle görülebilir	Cihaz ve deneyimli merkez gerektirir	Yok
	AFM	Üç boyutlu ölçüm verebilir Yüzey pürüzlülüğü verir	Cihaz ve deneyimli merkez gerektirir	Yok
	LSM	Sadece kalınlık değil, iç yapıyı da değerlendirir	Cihaz ve deneyimli merkez gerektirir	Yok
	MRI	Sadece kalınlık değil, iç yapıyı da değerlendirir	Cihaz ve deneyimli merkez gerektirir	Yok
	STXM	Sadece kalınlık değil, iç yapıyı da değerlendirir	Cihaz ve deneyimli merkez gerektirir	Yok
Moleküler yöntemler	Amplifikasyon temelli testler	Kolay Var-yok	Sadece genin varlığını gösterir	Var
	Array-çip teknolojisi	Birden fazla hedef seçilebilir	Pahalı Cihaz gerektirir	Yok
	Omik yaklaşımlar	Protein düzeyinde sonuç	Pahalı Cihaz gerektirir	Yok
Biyofilmin yerinde tanımlanması		Tıbbi cihaz yerinde korunmuş olur	Deneyim eksikliği	Var

SEM: Taramalı elektron mikroskopisi, TEM: Geçirimli elektron mikroskobu, AFM: Atomik güç mikroskobu, LSM: Lazer taramalı mikroskopi, MRG: Manyetik rezonans görüntüleme, STXM: Tarayıcı geçirmeli X-ray mikroskopisi, ESCMID: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

3. Biyofilm Tanısında Moleküler Yöntemlerin Yeri

Biyofilmin tanısında moleküler yöntemler iki amaç için kullanılabilir. Birincisi biyofilme katılan mikroorganizmanın moleküler hedef genler ile tanımlanmasıdır. İkinci amaç ise, mikroorganizma bulunduğu koşulda, biyofilm oluşumundan, adezyondan ve slime faktör yapımından sorumlu genlerin gösterilmesidir. Kullanılacak moleküler yöntem tek hedefe yönelik amplifikasyon temelli bir yöntem olabileceği gibi, biyofilm içinde artan ve azalan gen ifadenmesini hedefleyen bir "DNA array" sistemi de olabilir. DNA'nın gösterilmesi için, biyofilmden RNA izolasyonu ve ifadenme temelli bir

moleküler yöntem izlenmelidir. DNA'nın varlığı, her zaman, ifadenme (transkripsiyon) anlamına gelmemektedir. Biyofilm içinde "Quorum sensing" mekanizması işlemektedir. Sessiz genler bulunmakta ve gen susturumu (RNA silencing) gerçekleşmektedir. Doğrudan "omik" yaklaşımlar kullanılır ise, protein düzeyinde sonuç alınması mümkün olacaktır. Mikroorganizma türüne bağlı olarak adezyondan sorumlu genler değişmektedir. Biyofilm tanısına yönelik çalışmanın planlanması sırasında biyofilm genlerinin seçilmesi ve hedeflenecek genin dizisinin gen bankasından kontrol edilerek, primerlerin tasarlanması önerilmektedir. Biyofilm kütlesi içinde tek tek mikroorganizmalar ayrıldıktan sonra moleküler bir çalışma yürütülebilir veya

mikroorganizma ayrılmadan, doğrudan biyofilm DNA'sı/RNA'sı izole edilerek hedeflenen genler araştırılabilir^[19].

4. Biyofilm İlişkili Enfeksiyonun Enfeksiyon Yerinde Tanımlanması

Protez enfeksiyonlarının gelişiminde biyofilm oluşumu temel basamaktır. Bir protez bulunduğu yerde ya da çıkarıldıktan sonra üzerinde oluşan biyofilmin görüntülenmesi ve ölçülmesi mümkündür^[20]. Yukarıda anlatılan yöntemler ile biyofilm bulunduğu yerde değerlendirilebilir. Etken mikroorganizma tanımlanmadan, kütleyle görsel ve kantitatif yöntemlerle yaklaşılabılır. Protezin direkt sıvı veya katı besiyerine ekilmesi, protezden sonikasyon veya durulama sonrası örnek alınarak ekim yapılması^[21], floresan mikroskopi ve floresan *in situ* hibridizasyon, konfokal lazer tarama mikroskobisi, SEM, protezden DNA eldesi ve analizi sayesinde biyofilmin protez üzerinde tanımlanması yapılabilir^[22]. Biyofilm tanı yöntemlerinin avantajları, dezavantajları ve rehber önerileri Tablo 1'de karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir.

Biyofilm ile İlişkili Enfeksiyonlardan Korunma ve Enfeksiyonların Tedavisi

Biyofilm enfeksiyonlarından korunma yöntemlerinin başında antimikrobiyal profilaksi yöntemi gelmektedir. Preemptif, empirik ve kesin tedavi yöntemleri ise, daha çok enfeksiyon gelişirken veya geliştikten sonra uygulanan yöntemlerdir^[23,24].

Biyofilm Enfeksiyonlarından Korunma Yöntemleri

Profilaksi Yöntemi

Kısa süreli profilaksi: Cerrahi ilişkili biyofilm enfeksiyonlarını önlemek için, perioperatif dönemde uygulanan cerrahi antimikrobiyal profilaksi, en sık uygulanan kısa süreli profilaksi yöntemidir. Cerrahi profilaksi dışında, üriner kateterli/stentli hastalar için, bir veya iki haftalık olarak uygulanabilen, kısa süreli profilaksi yöntemi ile biyofilm enfeksiyonları geciktirebilir. Ancak bu profilaksi yöntemi, sistemik antibiyotik tedavisi olarak uygulanmasına bağlı olarak artan çok ilaca dirençli suşlarla süper-enfeksiyon gelişme riski nedeniyle kılavuzlarda önerilmemektedir^[1].

Kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonlarının (KİKDE) profilaksisi veya yara yeri biyofilm gelişimini önlemek için sistemik antibiyotik kullanımını destekleyen kanıt bulunmamaktadır. Ayrıca doku dolgu malzemelerinin enfeksiyonunu önlemek için de günümüzde öneri bulunmamaktadır^[1,25].

Orta ve uzun süreli endotrakeal tüp (ETT) biyofilm profilaksi yöntemleri: Selektif dekontaminasyon amacıyla orofarengeal/gastrik uygulanan, topikal, absorbe olmayan antibiyotiklerin profilakside kullanımı önerilmemektedir. İnhaler yüksek konsantrasyonda antibiyotiğin (örneğin; gentamisin), ETT

biyofilminden koruduğu gösterilmiştir. Gümüşlü ETT kaplanması ile entübasyondan sonra ilk 10 günde maksimal etki görülmüş, ventilatör ilişkili pnömoni (VİP) olan hastalarda ise mortalite ve maliyette azalma gösterilmiştir. Gümüş kaplı ETT kullanımı biyofilm profilaksisinde önerilmektedir^[26].

Tüp içinin mukus yıkayıcılar ile yıkanması, mekanik olarak biyofilmi ortadan kaldırmaya yönelik bir yöntem olup, az sayıda hasta gruplarında etkinliği gösterilmiştir. Pedyatrik hastalarda ETT biyofilminin, şişirilebilir balon yöntemiyle ortadan kaldırılabilmesine dair sınırlı sayıda çalışma da mevcuttur^[1].

Topikal Antibiyotik Kullanımı: Ortopedik araç (protez) ilişkili biyofilm enfeksiyon insidansını azaltmak için antibiyotik emdirilmiş materyaller (sıklıkla gentamisin, tobramisin ve vankomisin) kullanılmaktadır^[27]. Kısa süre kalan üriner kateterlerde antimikrobiyal (nitrofurantoin) kullanılması biyofilm enfeksiyonlarını önlemede yeterli olamamaktadır. Antibiyotik kaplanmış üriner kateterler biyofilm oluşumunu geciktirmekte, ancak önlememektedir. Gümüş kaplı veya nitrofurantoin emdirilmiş kateterlerin semptomatik üriner sistem enfeksiyonu insidansında azalma etkisi olmadığı için rutin kullanımda önerilmemektedir^[28]. İntravenöz kateter (örneğin; gümüş/minosiklin kaplı gibi), trakeal tüp (örneğin; gümüş kaplı), eklem protezleri, ortopedik cerrahi kemik sementleri için antibiyotik eklenmesi önerilmektedir^[1].

Kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonlarından korunma yöntemleri: Santral venöz kateter (SVK) ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonlarında klorheksidin emdirilmiş süngerler ve klorheksidinli örtülerin kullanımının KİKDE insidansını randomize kontrollü bir çalışmada %60-67 oranında azalttığı gösterilmiştir^[29]. Gümüş sülfadiazin, minosiklin ve rifampin kaplanmış kateterin etkinliği yapılan çalışmalar ve meta-analizler sonucunda gösterilmiş, ancak klinik kullanımı maliyet göz önüne alınınca sadece çok riskli hastalarla sınırlı kalmıştır^[29-32].

Antibiyotik Kilit Tekniği (AKT)

AKT konsantre antibiyotiklerin kateter lümeninde 12-24 saat süreyle devamlı bir şekilde uygulanmasıdır. Bu AKT profilaksi uygulaması, tekrarlayan KİKDE deneyimli hastalarda sınırlıdır. Uzun süreli kateterli olan hemodiyaliz hastalarında minosiklin-ETDA uygulamaları, heparine göre daha üstün bulunmuştur. Son yıllarda sayısı artan lokal uygulama ilaçlarından olan, taurolidine/sitrat antibiyotiklerden çok biyositlere benzemekte, bakterilere ve mantarlara karşı antimikrobiyal özelliğe sahip bir molekül olarak klinik kullanımı önerilmektedir. Yüksek riskli total parenteral nutrisyon (TPN) tedavisi alan hastalarda heparin ile taurolidine/sitratın karşılaştırıldığı çalışmalarda KİKDE azalttığı gösterilmiştir (heparin grubunda 1000 kateter gününde kan dolaşım enfeksiyon sayısı 1,3 iken, taurolidin/sitrat grubunda 0,3 olarak saptanmıştır)^[30]. Heparinsiz kullanıldığında tromboz riskini artırdığı gösterilmiştir^[29-31].

Kemoterapi verilen, TPN tedavisi alan yüksek riskli çocuk hematoloji hastalarında yapılan randomize kontrollü çalışmalarda %70 etanol uygulaması heparinle karşılaştırıldığında KİKDE oranlarında belirgin azalma saptanmıştır. Bu çalışmada 1000 kateter gününde kan dolaşım enfeksiyon sayısı etanol kilit tedavisi öncesi $12,2 \pm 10,6$ iken, etanol kilit tedavi sonrası $0,9 \pm 1,8$ 'e azaldığı gösterilmiştir^[33]. Meta-analizler, etanol kilit uygulamasının, heparin kilit uygulamasına göre KİKDE insidansında azalmada daha etkili olduğunu göstermiştir^[32]. Fakat tromboz riskini arttırılabilmektedir.

Mantar enfeksiyonlarını önlemek için ise amfoterisin B, etanol veya ekinokandinler ümit vericidir. Antibiyotik/antiseptik merhem uygulamaları *Candida* türlerinin yerleşimini arttırabileceğinden, enfeksiyon veya kolonizasyona neden olabilir^[33,34].

Biyofilm Enfeksiyonlarının preemptif Tedavisi

Etkin mikroorganizmanın izole edildiği, biyofilm enfeksiyonlu hastalarda, klinik semptom veya bulgu olmadan erken preemptif antibiyotik tedavisi ile eradikasyon yapılabilir. Kronik *P. aeruginosa*'lı akciğer enfeksiyonu olan kistik fibrozisli hastalarda, preemptif olarak sistemik veya inhaler antibiyotik eradikasyon tedavisi ile aralıklı kolonizasyon önlenir. Klinik bulgu olmadan tekrarlayan koagülaz negatif stafilokok (KNS) üremeleri olan SVK kolonizasyonu durumunda AKT (örneğin; KNS için vankomisin gibi) uygulanabilir. Ventilator ilişkili pnömoni, kronik yara enfeksiyonu, ortopedik protez ilişkili enfeksiyonlarda, üriner kateter ve üretral stent, doku dolgu uygulamaları için (örneğin; göğüs implantları gibi) veri ve öneri yoktur^[1].

Biyofilm Enfeksiyonlarında Tedavi

Biyofilm enfeksiyonlarında antibiyotik direnç gelişimi riskini azaltmak için farklı grup antibiyotikler veya biyofilm etkili yeni tedavi yöntemlerinin bir arada kullanıldığı, kombine tedaviler önerilmektedir^[1,3,4]. Mevcut tedavi dozları planktonik hücre yayılmasını önleyen dozlar olarak bilinmektedir. Biyofilm enfeksiyonlarının baskılamak için gerekli olan antibiyotik konsantrasyonu bilinmemektedir. Tedavi etkinliği klinik bulgular, semptomlar, kültür veya kültür bağımsız yöntemler ve görüntüleme teknikleri ile değerlendirilebilir. Tedavi kesildiğinde biyofilmde mikroorganizma yaşaması veya relaps riski artmaktadır. Tedavi sürecinde biyofilm oluşturan bakterilerin antibiyotik duyarlılığında azalma meydana gelebilmektedir^[35].

Protez enfeksiyonlarının tedavisi: Protez enfeksiyonlarında sinüs traktı yoksa, etken duyarlı ise, debritleme sonrası protezi çıkarmadan biyofilme uygun antibiyotik kombinasyonu ile uzun süre tedavi önerilmektedir. Özellikle başlangıç tedavisinde, antibiyotik kombinasyonu ile cerrahi debritleme/implant değişikliğinin kombine edilmesi, monoterapiden daha etkili

bulunmuştur. Stafilokoka karşı etkinliği açısından rifampisin ve Gram-olumsuz basillere karşı etkinliği açısından florokinolonlar kombinasyonda tercih edilebilmektedir^[35,36].

Kateter enfeksiyonlarının tedavisi: Kateter ilişkili kan dolaşım enfeksiyonlarında ya da trombositopeni nedeniyle kateteri çıkarılamayacak hastalarda gelişen *S. aureus* veya *Candida*'ya bağlı gelişen KİKDE'nin tedavisinde, daima sistemik antibiyotik/antifungal ile AKT birlikte verilmelidir^[1,37,38]. AKT ile 100-1000 kat yüksek minimum inhibisyon konsantrasyonu değerlerine 12-24 saat içinde ulaşılabilir. *S. aureus*'un hematogen komplikasyonları nedeniyle kateterin çıkarılması önerilmektedir. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* ilişkili kateter enfeksiyonunun tedavisi Infectious Disease Society of America (IDSA) rehberinde vankomisin veya daptomisin olarak önerilmektedir. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), International Society of Chemotherapy (ISC), European Society of Cardiology (ESC) rehberinin ortak önerilerinde ise vankomisin veya teikoplanin (yanıtsız durumda daptomisin) önerilmektedir. Vankomisin tedavisi altında persistan metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) bakteremi durumunda ise IDSA, ESCMID/ISC/ESC ortak önerisi olarak, yüksek doz daptomisin (10 mg/kg/gün) tedavisi + (gentamisin/rifampisin/linezolid/trimetoprim-sulfametoksazol/beta-laktam antibiyotik kombinasyonları şeklinde biyofilme etkili olan tedavi seçenekleri önerilmektedir^[38,39].

Kateteri çıkarılamayan kandidemili hastalarda antifungal kilit tedavisi uygulanabilmektedir. Antifungal kilit tedavisi için yapılan bir çalışmada *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*'in neden olduğu silikon kateter biyofilm modelinde, lipozomal amfoterisin B'nin %70 etkili olduğu gösterilmiştir^[37]. Son yıllarda diğer antifungal ilaç gruplarından ekinokandinler, antifungal kilit tedavisinde kullanılabilmektedir ve kandida biyofilmlerine karşı *in vitro* olarak iyi bir etkinliğe sahiptir. Amfoterisin B ve kaspofungin ile yapılan *in vitro* kandida biyofilm modellerinde en iyi antifungal aktiviteyi gösterirken, azol grubu ilaçların aktivitelerinin zayıf kaldığı gösterilmiştir^[34,37].

Ventilatör ilişkili pnömoni tedavisi: Endotrakeal tüp biyofilmini ortadan kaldırmak için sistemik antibiyotik yeterli değildir. Sistemik verilen antibiyotik konsantrasyonu akciğerde solunum kompartmanında bulunan planktonik bakterilere yeterli düzeyde olmakta, ancak bronş ve balgam biyofilminde üreyen bakteriler için konsantrasyonları yetersiz kalmaktadır. Sistemik ve inhale verilen kombine antibiyotikler akciğerdeki bu tabakalara yüksek konsantrasyonda ulaşabilmektedir^[1].

Üriner kateter ilişkili enfeksiyonların tedavisi: Antibiyotik tedavisi üriner kateterlerde. Biyofilm varlığında yetersiz kalmaktadır. Yalnızca mikroorganizmaların miktarını azaltmakta ve bu da semptom ve idrar kültüründe üreme olmasını baskılamaktadır. Eğer kateter çıkarılmazsa veya aynı yerden

tekrar yerleştirilirse tedavi sonunda relapslar görülebilmektedir. Böbrek atılımlı antibiyotiklerle birlikte kateter ve stent değişiminin birlikte uygulanması önerilmektedir^[1,24].

Kronik yara enfeksiyonlarının tedavisi: Kronik yara enfeksiyonlarında debritleme, vakum tedavi gibi antibiyotik dışı lokal tedavilerin eklenmesi önerilmektedir. Eğer sistemik tedavi verilecekse, farklı mekanizmalı iki sistemik antibiyotik kombinasyonu ve beraberinde lokal dezenfektanların birlikte kullanıldığı tedavi önerilmektedir. Yara iyileşmesini artırmak için debritleme daha çok önerilmektedir. Debritleme sonrası topikal antimikrobiyaller biyofilmin yeniden oluşmasını önlemek için etkili bulunmuştur. Negatif basınçlı yara ve irrigasyon tedavileri, kronik yaralarda biyofilm oluşmasını engellemekte olup, bakteri yükünü de azaltmaktadır^[1]. Kronik yara enfeksiyonlu hastaların çoğunu diyabetik ayak enfeksiyonlu hastalar oluşturmaktadır. Bu hastalarda biyofilm etkili lokal bor içeren (%3 sodium pentaborate pentahydrate) jellerin kullanımının yara iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir^[40].

Biyofilme Etkili Yeni Antibiyotikler ve Yeni Tedaviler

Biyofilme etkili yeni ilaçların hem biyofilm hem de planktonik evreye uygun antibiyotik tedavileri olarak hedeflenmesi ile ilgili çalışmalar devam etmektedir. "Quorum sensing" inhibitörleri (örneğin; laktonaz, patulin, penisillik asit, baicalein hidrat gibi antibiyofilme içeren maddeler) ile antibiyotiklerin (örneğin; tobramisin, gentamisin, siprofloksasin) kombine edilmesi ile geliştirilen yeni ilaçlar ümit vericidir. Ayrıca konakçının enflamatuvar cevabı nedeniyle biyofilm enfeksiyonu etrafında doku hasarına yönelik anti-enflamatuvar tedavi yaklaşımları, biyofilm matriksini ayrıştıran veya eriten ilaçlar, biyofilm komponentleri için enzim şelatörleri ile ilgili çalışmalar devam etmektedir^[4,41,42].

Biyofilmi eriten ilaçlar ve antibiyotikler ile oluşturulan yeni kombinasyonları, yeni geliştirilen topikal antibiyotik rejimleri, antimikrobiyallerin ultrasonografi, elektrik veya ultraviyole ışınlar ile kombinasyonları, enfekte kronik ülserlerin lokal tedavilerinde kullanılabilen lökosit ve trombosit zengin fibrinlerden oluşan "lökopatch" uygulamaları, kistik fibrozlu hastalarda görülen kronik biyofilm enfeksiyonlarına etkili *P. aeruginosa* karşı aşı çalışmaları, VIP'den korunma için ETT'ye uygulanan mukus yıkayıcıları gibi mekanik araçlar ile ilgili çok farklı alanlarda araştırmalar devam etmektedir^[1].

Gelecekte protez enfeksiyonlarını önlemek için aşı kullanılması, antibiyofilme kaplı protezler, protez yüzeyinin nanoteknoloji ile galvanizle kaplanması ve yüksek riskli hastalarda antibiyotik yüklenmiş sabit sementlerin artroplastide kullanılması söz konusu olacaktır^[43]. Son yıllarda yapılan bir *in vivo* hayvan modelinde, siprofloksasin ve rifampisin kaplanmış biyo-polimer

yapıda kitosin süngerlerin bakterileri *P. aeruginosa* (ATCC 27.317) ve *S. aureus* (ATCC 12598) baskıladığı gösterilmiştir^[44]. Nature dergisinde 2015 yılında yapılan bir çalışmada ise medikal cihaz ilişkili biyofilm enfeksiyonlarının tedavisinde antibiyotik tedavisi ile şok dalgaların kombinasyonunun kullanılabilirliği bildirilmiştir. Bu çalışmada, akciğerin biyofilm ilişkili, kronik *Pseudomonas* enfeksiyonunda ve stafilokokal yara enfeksiyonunda, siprofloksasin ile şok dalga kombinasyonunun başarılı olduğu gösterilmiştir^[45].

Antimikrobiyal Fotodinamik Tedavi

Toksik olmayan bir boyanın düşük enerjili bir ışık kaynağı ile aktive olarak, dokuda antimikrobiyal etki oluşturmaya dayalı yeni bir antimikrobiyal uygulamadır. Fotodinamik boya ile ışığın bir arada olması reaktif oksijen ürünlerini oluşturarak mikroorganizmada apoptozu uyarmaktadır. Bu yaklaşım, mikrobiyal topluluğun yok edilmesine ve biyofilmin temizlenmesine yardım etmektedir^[46]. Günümüzde "toluidine blue", metilen mavisi gibi daha çok topikal ve lokal etkili az sayıda onay almış fotodinamik antimikrobiyal ajan bulunmaktadır.

Fotodinamik tedavi, geniş etki spektrumu göstermesi, biyofilmdaki patojenleri eradike etmesi, dokuya toksisitesinin olmaması veya minimal olması, mikroorganizmaların direnç oluşturmaması, proenflamatuvar sitokinlerin salgılanmasına neden olmaması, memeli dokusuna zararsız olması, etki süresinin dakikalar kadar çok kısa olması, uygulamanın pratik ve ucuz olması nedeniyle avantajlıdır^[47].

Yeni tedavi yaklaşımlarından olan fotodinamik tedavi, klinikte daha çok deri hastalıklarında, diş tedavilerinde ve tümörlü hücrelerin inhibisyonunda kullanılmaktadır. Antimikrobiyal etkileri nedeniyle sinüzit, keratit, otitis media, nekrotizan fasiit, intra-abdominal apse, yanık/yara/deri enfeksiyonları, sistit, gastrik *Helicobacter pylori* enfeksiyonları, lokalize tüberküloz, fungal enfeksiyonlar ile ağız ve diş enfeksiyonları, MRSA vankomisin dirençli enterokok, *C. albicans* ve herpes simpleks virüs kaynaklı oral hastalıkların tedavisinde direnç sorununa karşı alternatif bir tedavi yöntemi olarak öngörülmektedir. Ancak son yıllarda geliştirilen kemilüminesans fotodinamik antimikrobiyal tedavi ile gelecekte fotodinamik tedavinin endoskopi, fiberoptik aletler ve transkutanöz iğne kullanılarak enfeksiyonlu diğer bölgeler ile derin enfeksiyonların tedavisinde de kullanılabilirliği düşünülmektedir^[48,49]. Medikal yenilik programı kapsamında 2015 yılında, nörojenik mesanelerde üriner enfeksiyonu önlemek için fotodinamik tedavi yöntemini kullanan mesane sondası üretilmiştir. Subkutanöz apseli bir hayvan modelinde "infrared" ışık ile aktifleştirilmiş termosensitif lipozomal tedavinin antibiyotik tedavisine sinerjik olduğunu gösteren bir çalışma yayımlanmıştır^[50].

İnatçı, kronik rinosinüzit tedavisinde, oral antibiyotiğin iki haftalık tedavisine topikal gümüş kolloid uygulaması

eklenmesinin başarılı olduğu bildirilmiştir^[51]. Polimikrobiyal veya dirençli mikroorganizmalar ile oluşan yara enfeksiyonlarının nitrik oksit uygulanmasından yarar gördükleri gösterilmiştir. Yapılan bu çalışmada nitrik oksidin *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *E. coli* ve *Candida* türlerde 2 ile 10-log kadar azalmaya, *P. aeruginosa*'da piyosyanin ve elastaz aktivitelerinde, sırasıyla 1.9 ve 3.2 kat azalmaya neden olduğu saptanmıştır^[52].

Sonuç

Biyofilm ilişkili enfeksiyonlar önemli bir sağlık sorunudur. Tanı ve tedavisinin zor olması nedeniyle yeni teknolojiler gelişmelere ihtiyaç duyulmaktadır. Kateter gibi yüzeylerde oluşan biyofilm ilişkili enfeksiyonlara etkili yeni tedaviler aranmaktadır^[53]. Biyofilm tanısı olduğu yerde veya izole edilen mikroorganizma özelinde yapılabilir. Mikrobiyolojik kültür yöntemleri yanında görüntüleme yöntemleri ve moleküler yöntemler de kullanılabilir^[54]. Yeni teknolojilerde, biyofilm oluşmuş tıbbi malzemenin olduğu yerde tanısı ve temizlenmesi hedeflenmektedir^[55-57].

Araştırmacılar özellikle biyofilm oluşumunun engellenmesine yönelik antibiyoterapiye eklenebilecek yeni teknolojileri değerlendiren çalışmalar planlayabilir. Doğal antimikrobiyal bileşikler, fotodinamik tedaviler bu alanda devam ettirilebilecek çalışma konuları arasındadır. Ayrıca, biyofilm oluşan tıbbi malzemenin yerinde tanısı ve temizlenmesi konusunda yapılacak karşılaştırmalı klinik çalışmalara da ihtiyaç bulunmaktadır.

Etik

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu ve editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

Yazarlık Katkıları

Cerrahi ve Medikal Uygulama: A.K., Ö.G.T., Konsept: A.K., Ö.G.T., Dizayn: A.K., Ö.G.T., Veri Toplama veya İşleme: A.K., Ö.G.T., Analiz veya Yorumlama: A.K., Ö.G.T., Literatür Arama: A.K., Ö.G.T., Yazan: A.K., Ö.G.T.

Çıkar Çatışması: Yazarlar bu makale ile ilgili olarak herhangi bir çıkar çatışması bildirmemiştir.

Finansal Destek: Çalışmamız için hiçbir kurum ya da kişiden finansal destek alınmamıştır.

Kaynaklar

1. Høiby N, Bjarnsholt T, Moser C, Bassi GL, Coenye T, Donelli G, Hall-Stoodley L, Holá V, Imbert C, Kirketerp-Møller K, Lebeaux D, Oliver A, Ullmann AJ, Williams C; ESCMID Study Group for Biofilms and Consulting External Expert Werner Zimmerli. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biyofilm infections 2014. Clin Microbiol Infect. 2015;21(Suppl 1):1-25.
2. Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz MA, Hussain T, Ali M, Rafiq M, Kamil MA. Bacterial biofilm and associated infections. J Chinese Med Assoc. 2018;81:7-11.
3. Ciofu O, Rojo-Molinero E, Macià MD, Oliver A. Antibiotic treatment of biofilm infections. APMIS. 2017;125:304-19.
4. Algburi A, Comito N, Kashtanov D, Dicks LMT, Chikindas ML. Control of biofilm formation: antibiotics and beyond. Appl Environ Microbiol. 2017;83:e02508-516.
5. Kumar A, Alam A, Rani M, Ehtesham NZ, Hasnain SE. Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. Int J Med Microbiol. 2017;307:481-9.
6. Swanson T, Wolcott RD, Wallis H, Woodmansey EJ. Understanding biofilm in practice: a global survey of health professionals. J Wound Care. 2017;26:426-40.
7. Pantanella F, Valenti P, Natalizi T, Passeri D, Berlutti F. Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. Ann Ig. 2013;25:31-42.
8. Temel A, Eraz B. Bacterial Biofilms: Detection Methods and Role in Antibiotic Resistance. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 2018;48:1-13.
9. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J Clin Microbiol. 1985;22:996-1006.
10. Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. Infect Immun. 1982;37:318-26.
11. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. J Clin Pathol. 1989;42:872-4.
12. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. J Clin Microbiol. 1999;37:1771-6.
13. Almsawit H, Macreadie I, Grando D. A simple and inexpensive device for biofilm analysis. J Microbiol Methods. 2014;98:59-63.
14. Santopolo L, Marchi E, Frediani L, Decorosi F, Viti C, Giovannetti L. A novel approach combining the calgary biofilm device and phenotype microarray for the characterization of the chemical sensitivity of bacterial biofilms. Biofouling. 2012;28:1023-32.
15. Sjollem J, Zaai SAJ, Fontaine V, Ramstedt M, Luginbuehl R, Thevissen K, Li J, van der Mei HC, Busscher HJ. *In vitro* methods for the evaluation of antimicrobial surface designs. Acta Biomater. 2018;70:12-24.
16. Lagree K, Desai JV, Finkel JS, Lanni F. Microscopy of fungal biofilms. Curr Opin Microbiol. 2018;43:100-7.
17. Azeredo J, Azevedo NF, Briandet R, Cerca N, Coenye T, Costa AR, Desvaux M, Di Bonaventura G, Hébraud M, Jaglic Z, Kazianová M, Knöchel S, Lourenço A, Mergulhão F, Meyer RL, Nychas G, Simões M, Tresse O, Sternberg C. Critical review on biofilm methods. Crit Rev Microbiol. 2017;43:313-51.
18. Neu TR, Manz B, Volke F, Dynes JJ, Hitchcock AP, Lawrence JR. Advanced imaging techniques for assessment of structure, composition and function in biofilm systems. FEMS Microbiol Ecol. 2010;72:1-21.
19. Hall CW, Mah TF. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. FEMS Microbiol Rev. 2017;41:276-301.
20. Drago L, De Vecchi E. Microbiological diagnosis of implant-related infections: scientific evidence and cost/benefit analysis of routine antibiofilm processing. Adv Exp Med Biol. 2017;971:51-67.
21. Liu H, Zhang Y, Li L, Zou HC. The application of sonication in diagnosis of periprosthetic joint infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2017;36:1-9.
22. Xu Y, Larsen LH, Lorenzen J, Hall-Stoodley L, Kikhney J, Moter A, Thomsen TR. Microbiological diagnosis of device-related biofilm infections. APMIS. 2017;125:289-303.

23. Percival SL, Suleman L, Vuotto C, Donelli G. Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. *J Med Microbiol*. 2015;64:323-34.
24. Hooton TM, Bradley SF, Cardenas DD, Colgan R, Geerlings SE, Rice JC, Saint S, Schaeffer AJ, Tambayh PA, Tenke P, Nicolle LE; Infectious Diseases Society of America. Diagnosis, prevention, and treatment of catheter associated urinary tract infection in adults: 2009 International Clinical Practice Guidelines from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2010;50:625-63.
25. Conway LJ, Larson EL. Guidelines to prevent catheter-associated urinary tract infection: 1980 to 2010. *Heart Lung*. 2012;41:271-8.
26. Afessa B, Shorr AF, Anzueto AR, Craven DE, Schinner R, Kollef MH. Association between a silver-coated endotracheal tube and reduced mortality in patients with ventilator-associated pneumonia. *Chest*. 2010;137:1015-21.
27. Marschall J, Lane MA, Beekmann SE, Polgreen PM, Babcock HM. Current management of prosthetic joint infections in adults: results of an emerging infections network survey. *Int J Antimicrob Agents*. 2013;41:272-7.
28. Pickard R, Lam T, MacLennan G, Starr K, Kilonzo M, McPherson G, Gillies K, McDonald A, Walton K, Buckley B, Glazener C, Boachie C, Burr J, Norrie J, Vale L, Grant A, N'Dow J. Antimicrobial catheters for reduction of symptomatic urinary tract infection in adults requiring short-term catheterisation in hospital: a multicentre randomised controlled trial. *Lancet*. 2012;380:1927-35.
29. Timsit JF, Mimoz O, Mourvillier B, Souweine B, Garrouste-Orgeas M, Alfandari S, Plantefeve G, Bronchard R, Troche G, Gauzit R, Antona M, Canet E, Bohe J, Lepape A, Vesin A, Arrault X, Schwebel C, Adrie C, Zahar JR, Ruckly S, Tournegros C, Lucet JC. Randomized controlled trial of chlorhexidine dressing and highly adhesive dressing for preventing catheter-related infections in critically ill adults. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185:1272-8.
30. Dümichen MJ, Seeger K, Lode HN, Köhl JS, Ebell W, Degenhardt P, Singer M, Geffers C, Querefeld U. Randomized controlled trial of tauridine citrate versus heparin as catheter lock solution in paediatric patients with haematological malignancies. *J Hosp Infect*. 2012;80:304-9.
31. Novikov A, Lam MY, Mermel LA, Casey AL, Elliott TS, Nightingale P. Impact of catheter antimicrobial coating on species-specific risk of catheter colonization: a meta-analysis. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2012;1:40.
32. Broom JK, Krishnasamy R, Hawley CM, Playford EG, Johnson DW. A randomised controlled trial of heparin versus ethanol lock therapy for the prevention of catheter associated infection in haemodialysis patients-the HEALTHY-CATH trial. *BMC Nephrol*. 2012;13:146.
33. Wales PW, Kosar C, Carricato M, de Silva N, Lang K, Avitzur Y. Ethanol lock therapy to reduce the incidence of catheter-related bloodstream infections in home parenteral nutrition patients with intestinal failure: preliminary experience. *J Pediatr Surg*. 2011;46:951-6.
34. Walraven CJ, Lee SA. Antifungal lock therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57:1-8.
35. Souli M, Giamarellou H. Effects of slime produced by clinical isolates of coagulase-negative staphylococci on activities of various antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42:939-41.
36. Parvizi J, Gehrke T, Chen AF. Proceedings of the International Consensus on Periprosthetic Joint Infection. 2013;95-B(11):1450-2.
37. Toulet D, Debarre C, Imbert C. Could liposomal amphotericin B lock solutions be useful to inhibit *Candida* spp. biofilms on silicone biomaterials? *J Antimicrob Chemother*. 2012;67:430-2.
38. Rijnders BJ, Van Wijngaarden E, Vandecasteele SJ, Stas M, Peetermans WE. Treatment of long-term intravascular catheter-related bacteraemia with antibiotic lock: randomized, placebo-controlled trial. *J Antimicrob Chemother*. 2005;55:90-4.
39. Hassoun A, Linden PK, Friedman B. Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations-a review of recent developments in MRSA management and treatment. *Crit Care*. 2017;21:211.
40. Demirci S, Doğan A, Aydın S, Dülger EÇ, Şahin F. Boron promotes streptozotocin-induced diabetic wound healing: roles in cell proliferation and migration, growth factor expression, and inflammation. *Mol Cell Biochem*. 2016;417:119-33.
41. Akova M. Biofilm and Antibiotic Resistance. *Türkiye Klinikleri J Inf Dis-Special Topics*. 2011;4:28-31.
42. Sakarya S. Anti-biyofilm Stratejileri. Sakarya S, ed. *Biyofilm enfeksiyonları*. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri. 2018;66-72.
43. Berbari E, Segreti J, Parvizi J, Berrios-Torres SI. Future research opportunities in peri-prosthetic joint infection prevention. *Surg Infect (Larchmt)*. 2017;18:409-12.
44. Wells CM, Beenken KE, Smeltzer MS, Courtney HS, Jennings JA, Haggard WO. Ciprofloxacin and rifampin dual antibiotic-loaded biopolymer chitosan sponge for bacterial inhibition. *Mil Med*. 2018;183(Suppl 1):433-44.
45. Gnanadhas DP, Elango M, Janardhanraj S, Srinandan CS, Datey A, Strugnell RA, Gopalan J, Chakravorty D. Successful treatment of biofilm infections using shock waves combined with antibiotic therapy. *Nature Sci Rep*. 2015;5:17440.
46. Güzel Tunçcan Ö, Kalkancı A, Unal EA, Abdulmajed O, Erdoğan M, Dizbay M, Çağlar K. The *in vitro* effect of antimicrobial photodynamic therapy on *Candida* and *Staphylococcus* biofilms. *Turk J Med Sci*. 2018;48:873-9.
47. Börekçi G, Erdoğan Eliuz E. Photoantimicrobials and Photodynamic Antimicrobial Therapy in Search of Antibiotics. *ANKEM Derg*. 2017;31:116-26.
48. Oniszczuk A, Wojtunik-Kulesza KA, Oniszczuk T, Kasprzak K. The potential of photodynamic therapy (PDT)-Experimental investigations and clinical use. *Biomed Pharmacother*. 2016;83:912-29.
49. Huang L, Dai T, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic inactivation and photodynamic therapy for infections. *Methods Mol Biol*. 2010;635:155-73.
50. Zhao Y, Dai X, Wei X, Yu Y, Chen X, Zhang X, Li C. Near-infrared light-activated thermosensitive liposomes as efficient agents for photothermal and antibiotic synergistic therapy of bacterial biofilm. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018;10:14426-37.
51. Ooi ML, Richter K, Bennett C, Macias-Valle L, Vreugde S, Psaltis AJ, Wormald PJ. Topical colloidal silver for the treatment of recalcitrant chronic rhinosinusitis. *Front Microbiol*. 2018;9:720.
52. Waite RD, Stewart JE, Stephen AS, Allaker RP. Activity of a nitric oxide-generating wound treatment system against wound pathogen biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2018;52:338-43.
53. Alonso B, Pérez-Granda MJ, Rodríguez-Huerta A, Rodríguez C, Bouza E, Guembe M. The optimal ethanol lock therapy regimen for treatment of biofilm-associated catheter infections: Results from an *in vitro* study. *J Hosp Infect*. 2018;100:187-95.
54. Schlafer S, Meyer RL. Confocal microscopy imaging of the biofilm matrix. *J Microbiol Methods*. 2017;138:50-9.
55. Lopes SP, Azevedo NF, Pereira MO. Quantitative assessment of individual populations within polymicrobial biofilms. *Sci Rep*. 2018;8:9494.
56. Arciola CR, Campoccia D, Montanaro L. Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16:397-409.
57. Sjollem J, Zaat SAJ, Fontaine V, Ramstedt M, Luginbuehl R, Thevissen K, Li J, van der Mei HC, Busscher HJ. *In vitro* methods for the evaluation of antimicrobial surface designs. *Acta Biomater*. 2018;70:12-24.